

PCT

ORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/00, A01K 67/027, C07K 14/82, A61K 49/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/44889 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. August 2000 (03.08.00)
---	----	--

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/00232
(22) Internationales Anmeldedatum: 26. Januar 2000 (26.01.00)
(30) Prioritätsdaten:
199 03 371.4 28. Januar 1999 (28.01.99) DE
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MICE &
MORE GMBH & CO. KG [DE/DE]; Martinistrasse 52,
D-20251 Hamburg (DE).
(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHULZE-GARG, Chris-
tine [DE/DE]; Mortagneweg 7, D-21521 Aumühle (DE).
DEPPERT, Wolfgang [DE/DE]; Im Hain 14, D-22359
Hamburg (DE).
(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger
Strasse 246, D-81825 München (DE).

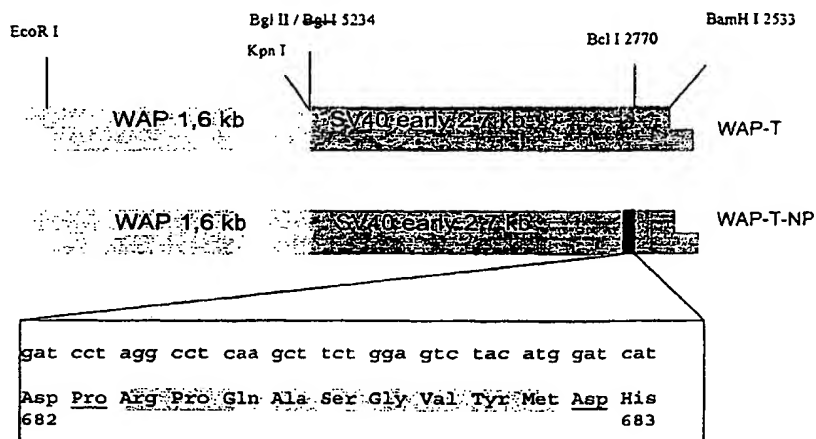
(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE,
CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

Veröffentlicht

*Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.*

(54) Title: MAMMAL, METHOD FOR PRODUCING SAME AND ITS USE

(54) Bezeichnung: SÄUGETIER SOWIE VERFAHREN ZU SEINER HERSTELLUNG UND SEINE VERWENDUNG



(57) Abstract

The invention relates to a mammal with inducible ductal carcinoma in situ (DCIS) and containing a prolactin-activated oncogene. The invention also relates to a method for producing such a mammal and to its use for studying a DCIS and the progression thereof towards invasive ductal carcinoma of the breast, as well as for developing diagnostic or therapeutic means for this purpose.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Säugetier mit induzierbarem ductalen Karzinom in situ (DCIS), wobei das Säugetier ein durch laktotrope Hormone aktivierbares Onkogen enthält. Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Säugetiers sowie dessen Verwendung zur Untersuchung eines DCIS bzw. seiner Progression zu einem invasiven ductalen Mammakarzinom, sowie zur Entwicklung von diagnostischen bzw. therapeutischen Mitteln hierfür.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Säugetier sowie Verfahren zu seiner Herstellung und seine Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Säugetier, in dem ein
5 duktales Karzinom in situ (DCIS) der weiblichen Brustdrüse
induziert werden kann. Ferner betrifft die Erfindung ein
Verfahren zur Herstellung eines solchen Säugetiers sowie
dessen Verwendung zur Untersuchung eines DCIS bzw. seiner
Progression zu einem invasiven ductalen Mammakarzinom, sowie
10 zur Entwicklung von diagnostischen bzw. therapeutischen
Mitteln hierfür.

Das Mammakarzinom ist mit einer Häufigkeit von ca. 10 % in der
weiblichen Bevölkerung eines der drängenden
15 Gesundheitsprobleme unserer Zeit. Etwa 80 % der Mammakarzinome
sind invasive ductale Mammakarzinome. Bei Mammographien werden
häufig Mammatumoren vom Typ eines ductalen Karzinoms in situ
(DCIS) diagnostiziert. Dieses kennzeichnet sich durch eine
nicht-invasive, d.h. die Basalmembran noch nicht
20 durchbrechende, neoplastische Vermehrung von Epithelzellen in
das Lumen der ductulo-lobulären Einheit des Milchdrüsensy-
stems. Ein DCIS kann sich zu einem invasiven ductalen
Mammakarzinom entwickeln. Die molekularen Ursachen hierfür
sind allerdings nicht bekannt. Ebensowenig ist eine Vorhersage
25 möglich, ob und wann eine solche Entwicklung entritt. Als
Folge hiervon wird bei der Diagnose eines DCIS der weiblichen
Brust meist eine radikale Mastektomie, d.h. vollständige
Entfernung der weiblichen Brust und regionärer Lymphknoten,
durchgeführt. Schätzungen ergeben allerdings, daß etwa 60 %
30 der radikalen Mastektomien eine Übertherapierung darstellen.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde,
ein Mittel bereitzustellen, mit dem die molekularen Ursachen
eines DCIS, insbesondere seiner Progression zu einem invasiven
ductalen Mammakarzinom, untersucht und gegebenenfalls Wege
35

für eine verlässliche Diagnose bzw. angemessene Therapie aufgezeigt werden können.

5 Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß ein DCIS der weiblichen Brustdrüse in Säugetieren, z.B. Mäusen, induziert werden kann, die ein
10 Onkogen, z.B. die frühe Region von SV40, d.h. das Gen für das SV40 T-Ag enthalten, das durch laktotrope Hormone, wie Oestrogen, Prolactin, Insulin und Hydrocortison, aktivierbar ist. Ferner hat er erkannt, daß sich das DCIS zu einem invasiven ductalen Mammakarzinom entwickeln kann.

15 Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein Säugetier mit einem induzierbaren DCIS der weiblichen Brustdrüse bereitzustellen, das ein durch laktotrope Hormone aktivierbares Onkogen enthält. Vorzugsweise kann sich das DCIS
20 zu einem invasiven duktalem Mammakarzinom entwickeln.

Der Ausdruck "DCIS der weiblichen Brustdrüse" weist auf eine nicht-invasive, d.h. die Basalmembran noch nicht durchbrechende, neoplastische Vermehrung von Epithelzellen in
25 das Lumen der ductulo-lobulären Einheit des Milchdrüsensystems hin. Insbesondere zeichnet sich das DCIS durch histologische Merkmale, wie hyperchromatische, pleomorphe, grobschollig strukturierte oder auffällig große Kerne, aus. Ferner kann es eine verschobene Kern-Plasma-Relation oder zahlreiche
30 Mitosefiguren ausweisen. Desweiteren kann sich das DCIS dadurch kennzeichnen, daß sich die Proliferation der Epithelzellen in das Lumen des Ducts als mehrlagige oder siebförmige Auskleidung bzw. als intraluminale Verzweigung oder mikropapillär zeigen. Darüberhinaus kann sich das DCIS
35 durch Nekrosen, Apoptosefiguren, Psammomkörper, d.h. zwiebelschalenartige Kristallisationsprodukte mit Kalkeinlagerungen, im Lumen des Ducts und Verlust der der Basalmembran unterliegenden Myoepithelschicht ausweisen.

Der Ausdruck "laktotrope Hormone" weist auf Hormone hin, die von Säugetieren, z.B. in der Schwangerschaft und/oder Laktationsperiode, ausgeschüttet werden und laktotrop wirken. Beispiele solcher Hormone umfassen Oestrogen, Prolactin, Insulin und Hydrocortison.

Der Ausdruck "Onkogen" umfaßt jegliche Gene bzw. Teile davon, die eine Zell-transformierende Eigenschaft aufweisen können. Beispiele solcher Gene umfassen erb A, erb B, fos, myc, E6, E7 und die frühe Region von SV40, d.h. das Gen für das SV40 T-Ag, und mutiertes p53. Ferner kann das Onkogen Sequenzen aufweisen, die für ein starkes, d.h. immundominantes, T-Zell-Epitop, z.B. das MHCI restringierte Epitop n118 des Nucleoproteins des LCM-Virus, kodieren.

Der Ausdruck "durch laktotrope Hormone aktivierbares Onkogen" weist darauf hin, daß vorstehendes Onkogen durch laktotrope Hormone aktivierbar ist. Dies kann in verschiedenster Weise erreicht werden. Günstig kann es sein das Onkogen unter die Kontrolle eines Promotors zu stellen, der für ein oder mehrere laktotrope Hormone spezifisch ist. Ein solcher Promotor ist z.B. der "whey acidic protein" (WAP)-Promotor. Seine Spezifität umfaßt die laktotropen Hormone, Oestrogen, Prolactin, Insulin und Hydrocortison. Es wird auf nachstehende Ausführungen hinsichtlich der Herstellung eines erfindungsgemäßen Säugetiers verwiesen.

Der Ausdruck "Säugetier" umfaßt jegliche Säugetiere mit Ausnahme des Menschen, die laktotrope Hormone, z.B. in der Schwangerschaft und/oder Laktationsperiode, ausschütten und in denen ein durch laktotrope Hormone aktivierbares Onkogen vorliegen kann. Beispiele solcher Säugetiere umfassen Mäuse, Ratten, Kaninchen, Pferde, Rinder, Schafe, Ziegen, Affen, Schweine, Hunde und Katzen, wobei Mäuse insbesondere genannt werden.

Bevorzugte Säugetiere der vorliegenden Erfindung sind Mäuse, die das Gen für das SV40 T-Ag unter der Kontrolle des WAP-

Promotors enthalten. Auch kann das SV40 T-Ag-Gen Sequenzen enthalten, die für ein starkes, d.h. immundominantes, T-Zell-Epitop, z.B. das Epitop n118 des Nucleoproteins des LCM-Virus kodieren, enthalten. Solche Mäuse werden mit WAP-T bzw. WAP-T-NP bezeichnet (vgl. Fig. 1). Besonders bevorzugt sind die Mäuse WAP-T-1, WAP-T-2, WAP-T-10, WAP-T-NP6, WAP-T-NP8 und WAP-T-NP10. Diese Mäuse kennzeichnen sich wie folgt:

WAP-T-1

Diese Mäuse entwickeln durchschnittlich 7 Monate nach Induktion mit laktotropen Hormonen meist multifokale invasive ductale Mammakarzinome. Es ist keine präferentielle Tumorentstehung in einer der Mammae zu beobachten. Invasive Karzinome sind in der Regel tubulär bis papillär differenziert, mit z.T. soliden anaplastischen Anteilen, die auch eine desmoplastische Reaktion zeigen können. Gelegentlich treten Lungenmetastasen auf. Die Mehrzahl der Tiere entwickelt jedoch keine Metastasen und die Primärtumoren wachsen nur langsam. Makroskopisch nicht befallene Mammae zeigen multifokale DCIS. Die meisten DCIS können aufgrund des isomorphen Erscheinungsbildes der Kerne als "low grade" in Analogie zur Klassifizierung humaner DCIS nach NUYS Index eingestuft werden. Komedonekrosen und Psammomkörper werden gelegentlich beobachtet. Die Ausbildung von intraluminalen Verzweigungen ("roman arches" Bildung) kommt dagegen vor (vgl. Fig. 4).

WAP-T-2

Diese Tiere weisen ein hellbraunes Fell auf. Ferner entwickeln sie etwa 6 Monate nach Induktion mit laktotropen Hormonen invasive ductale Mammakarzinome. Differenzierte Mammakarzinome sind vorwiegend tubulär bis lobulär. Anaplastische Mammakarzinome präsentieren sich mit einigen Tumorzellsenzellen. Mikrometastasen in Lymphknoten werden beobachtet. In seltenen Fällen kann es zur Entstehung von Fibrosarkomen ausgehend von der Mamma oder dem Uterus kommen. Die multifokal auftretenden DCIS zeigen mikropapilläre und cribriforme

Wachstumsmuster. Auch einlagig ausgekleidete Formen mit Komedonekrose oder Psammomkörpern werden beobachtet. Da sich die Zellkerne meist isomorph präsentieren, können diese DCIS als nicht "high grade" (vgl. vorstehend) bewertet werden (vgl. Fig. 5).

WAP-T-10

Diese Mäuse entwickeln etwa 8 Monate nach Induktion mit laktotropen Hormonen palpierbare ductale Mammakarzinome, die metastasieren können. Es werden sowohl solide und wenig differenzierte Karzinome, die zahlreiche Mitosen aufweisen, als auch tubuläre bis papilläre Formen gefunden. Die untersuchten Metastasen sind papillär differenziert. Die multifokal auftretenden DCIS weisen Komedonekrosen auf und entsprechen aufgrund der Kernmorphologie (Pleomorphie, Hyperchromasie, u.a.) einem "high grade" DCIS (vgl. vorstehend; und Fig. 6).

WAP-T-NP6

Diese Mäuse entwickeln etwa 11 Monate nach mehrfacher Induktion mit laktotropen Hormon palpierbare invasive Karzinome. In seltenen Fällen treten auch hepatozelluläre Adenome sowie Speicheldrüsenadenome auf. Die Mammakarzinome sind vorwiegend tubulär oder papillär differenziert, gelegentlich nur mäßig differenziert mit ausgedehnten Nekrosen und teilweise auch solide. In mammären Lymphknoten treten Mikrometastasen auf. Die Zellkerne der multifokal auftretenden DCIS sind meist unauffällig "low grade" (vgl. vorstehend) und es sind Komedonekrosen vorhanden (vgl. Fig. 7).

WAP-T-NP8

Diese Mäuse entwickeln etwa 5 Monate nach Induktion mit laktotropen Hormonen invasive ductale Karzinome. Es werden sowohl tubulo-papillär differenzierte als auch schlecht differenzierte, solide Tumore gefunden. Tiere mit schlecht differenzierten Tumoren zeigen Lungenmetastasen. Die Lumen umschriebener kleiner invasiver Karzinome und von DCIS sind in

einigen Fällen von Granulozyten infiltriert. Gelegentlich treten auch nicht epitheliale Tumoren mammären Ursprungs, z.B. Fibro- und Osteosarkome, sowie infiltrierende histiozytäre Sarkome auf. Die zwischen 15 und 20 Wochen nach Induktion mit laktotropen Hormonen apparenten multifokalen DCIS entsprechen aufgrund der Kernmorphologie einer "high grade" Form (vgl. vorstehend; und Fig. 8).

WAP-T-NP10

Diese Mäuse entwickeln etwa 11 Monate nach mehreren Induktionen mit laktotropen Hormonen ein invasives ductales Mammakarzinom. Diese Karzinome sind häufig tubulär bis papillär differenziert mit soliden und nekrotischen, aber nur mäßig differenzierten Anteilen. Die DCIS präsentieren sich mit isomorphen Kernen (nicht "high grade"; vgl. vorstehend). Es treten DCIS mit mikropapillärem Wachstum sowie Formen mit totalem Verlust der Myoepithelschicht und Psammomkörperbildung auf (vgl. Fig. 9).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Zellen, die aus dem erfindungsgemäßen Säugetier erhalten werden. Diese Zellen können in jeglicher Form vorliegen, z.B. in einer Primär- oder Langzeit-Kultur.

Ein erfindungsgemäßes Säugetier kann durch übliche Verfahren bereitgestellt werden. Günstig kann ein Verfahren sein, das folgende Schritte umfaßt:

- (a) Einführung einer für ein Onkogen kodierenden DNA in befruchtete Oocyten eines Säugetiers, wobei die DNA unter der Kontrolle eines Promotors steht, der für laktotrope Hormone spezifisch ist,
- (b) Implantierung der Oocyten von (a) in pseudoschwangere Säugetiere, und
- (c) Selektion der in (b) erhaltenen Nachkommen auf die Bildung eines DCIS.

Hinsichtlich der Ausdrücke "Onkogen", "laktotrope Hormone",

"Säugetiere" und "DCIS" wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

5 Ferner weist der Ausdruck "pseudoschwangere Säugetiere" auf solche Säugetiere hin, die mit nicht zeugungsfähigen, d.h. serilen oder vasktomierten, männlichen Säugetieren, verpaart worden sind und einen Vaginalpfropfen aufweisen. Es wird auf das nachstehende Beispiel verwiesen.

10 Der Ausdruck "befruchtete Oocyten" weist auf Oocyten von schwangeren Säugetieren hin, die entleert worden sind. Es wird auf das nachstehende Beispiel verwiesen.

15 Der Ausdruck "DNA, die für ein Onkogen kodiert und unter der Kontrolle eines Promotors steht, der für laktotrope Hormone spezifisch ist" betrifft eine in jeglicher Form vorliegende DNA, die diese Eigenschaften aufweist. Die DNA kann als solche oder in Kombination mit einer anderen DNA, z.B. einem Vektor, vorliegen. Ferner kann sie zirkulär oder linear vorliegen.
20 Desweiteren kann sie Sequenzen enthalten, die eine Rekombination mit der DNA des Säugetiers fördern. Darüberhinaus kann sie Sequenzen enthalten, die für ein T-Zell-Epitop, z.B. das MHC I restringierte Epitop n118 des Nukleoproteins des LCM-Virus, kodieren. Eine solche DNA wurde
25 bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) als pWAP-T-NP unter DSM 12608 am 22. Dezember 1998 hinterlegt.

30 Desweiteren kennt der Fachmann Bedingungen und Materialien, um die Schritte (a)-(c) durchzuführen. Hinsichtlich der Selektion in (c) wird er z.B. auf Verfahren zurückgreifen, mit denen die vorstehend erwähnten histologischen Merkmale nachgewiesen werden können.

35 Mit der vorliegenden Erfindung wird ein Säugetier bereitgestellt, in dem ein DCIS induziert werden kann. Ferner kann sich aus dem DCIS ein invasives ductales Mammakarzinom entwickeln. Damit können die molekularen Ursachen eines DCIS

bzw. seiner Progression zu einem invasiven ductalen Mammakarzinom untersucht werden. Insbesondere ist es von Vorteil, daß Säugetiere bereitgestellt werden können, die unterschiedlich lange Latenzzeiten bis zur Entwicklung eines DCIS bzw. eines invasiven ductalen Karzinoms aufweisen, wodurch mittels einer vergleichenden Untersuchung eine Korrelation zwischen DCIS-Typ (inklusive der identifizierten molekularen Marker) und Risiko des DCIS hergestellt werden kann. Desweiteren ist es von Vorteil, daß die Rolle des Immunsystems bei der Ausbildung eines DCIS bzw. seiner Progression zu einem invasiven ductalen Mammakarzinom untersucht werden kann, was durch das Vorliegen eines starken T-Zell-Epitops im Onkogen-Produkt begünstigt wird. Darüber hinaus liefert die vorliegende Erfindung eine Basis diagnostische Marker zu entwickeln, mit denen einzelne Entwicklungsstufen des DCIS bzw. des invasiven ductalen Karzinoms nachgewiesen und somit Vorhersagen über die Entwicklung des DCIS bzw. seiner Progression getroffen werden können. Desweiteren gibt die vorliegende Erfindung die Möglichkeit, Therapeutika gegen vorstehende Erkrankungen zu entwickeln.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

Fig. 1 zeigt eine für die Herstellung einer erfindungsgemäßen Maus verwendete DNA, die für das SV40 T-Ag bzw. ein das n118 Epitop des LCM-Virus enthaltendes SV40 T-Ag (SV40 T-Ag-NP) kodiert. Die DNA wird in linearer Form verwendet und in befruchtete Oocyten injiziert.

Fig. 2 zeigt die Expression von SV40 T-Ag bzw. SV40 T-Ag-NP in der Mammae erfindungsgemäßer Mäuse.

(a) Nukleäre Expression von SV40 T-AG in den Epithelzellen morphologisch unauffälliger Ductuli 12 Monate nach Induktion der erfindungsgemäßen Maus WAP-T-1.

(b) Nukleäre Expression von T-Ag in den Tumorzellen von DCIS 12 Monate nach Induktion

der erfindungsgemäßen Maus WAP-T-NP6.

Fig. 3 zeigt Beispiele häufiger Tumorphänotypen von erfindungsgemäßen Mäusen. In Paraffin eingebetete Schnitte, H&E-Färbung:

(a) Tubulär bis papillär differenziertes invasives ductales Mammakarzinom mit desmoplastischer Reaktion der Maus WAP-T-10.

(b) Anaplastisches invasives ductales Mammakarzinom mit ausgedehnten Nekrosen der Maus WAP-T-NP8.

Fig. 4 zeigt in der DCIS Maus WAP-T-1 ein induziertes DCIS mit relativ unauffälligen Kernen, z.T. mit intraluminaler Verzweigung, Psammomkörpern und Komedonekrose.

Fig. 5 zeigt in der DCIS Maus WAP-T-2 ein induziertes DCIS mit mikropapillärem Wachstumsmuster, desmoplastischer Reaktion und entzündlichen Infiltraten, daneben auch ein- bis mehrlagig ausgekleidetes DCIS mit Psammomkörpern und Komedonekrose.

Fig. 6 zeigt in der DCIS Maus WAP-T-10 mehrere induzierte DCIS mit hyperchromatischen, pleomorphen Kernen. In der Umgebung sind entzündliche Infiltrate erkennbar.

Fig. 7 zeigt in der DCIS Maus WAP-T-NP6 ein induziertes DCIS mit meist unauffälligen Kernen und gelegentlichen Komedonekrosen. Es sind einlagige und lokal mehrlagige Auskleidungen der ductalen Lumen sichtbar.

Fig. 8 zeigt in der DCIS Maus WAP-T-NP8 mehrere induzierte DCIS mit pleomorphen, z.T. auffällig großen Kernen und Psammomkörpern.

Fig. 9 zeigt in der DCIS Maus WAP-T-NP10 ein induziertes DCIS mit relativ isomorphen Kernen und

mikropapillärem und z.T. intraluminale Verzweigungen bildendem Wachstumsmuster.

Die Erfindung wird durch das Beispiel erläutert.

5

Beispiel: Herstellung eines erfindungsgemäßen Säugetiers

10 Etwa 20 weibliche CB6F1 Mäuse im Alter von 4-5 Wochen werden durch intra peritoneale Injektion von 5 U PMS (pregnant mare's serum) am Tag 1 und eine weitere intra peritoneale Injektion von 5 U hCG (humanes Choriongonadotropin) am Tag 3
15 superovuliert und am Abend desselben Tages mit männlichen CB6F1 Tieren verpaart. Am Morgen des 4. Tages werden die Tiere auf das Vorhandensein eines Vaginalpfropfens untersucht, positive Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Ovidukte entnommen. Die Eizellen werden aus den Ovidukten in M2 Medium entleert, die Cumuluszellen durch kurze Inkubation mit Hyaluronidase abgelöst, die Eizellen gründlich gewaschen und bis zur Mikroinjektion in mit Paraffinöl überschichtetem
20 M16 Medium im Brutschrank (5 % CO₂, 85 % Luftfeuchtigkeit, 37°C) aufbewahrt.

Die Injektion der DNA von Fig. 1 erfolgt am 4. Tag in der Regel in den männlichen Vorkern befruchteter Eizellen.
25 Injizierte Eizellen werden anschließend im Brutschrank bis zum Retransfer am darauffolgenden Tag inkubiert. Zur Bereitstellung von pseudoschwangeren Fostermäusen werden am Abend vor der Mikroinjektion etwa 25 weibliche B6CBAF1 Mäuse im Alter von 8 bis 12 Wochen mit vasektomierten männlichen Mäusen
30 verpaart. Am Morgen des 5. Tages werden die Tiere mit Vaginalpfropfen für den Retransfer der injizierten Eizellen ausgewählt. Die über Nacht kultivierten und zum Zweizellstadium proliferierten und mikroinjizierten Eizellen werden am 5. Tag reimplantiert. Dabei werden 10-15 Embryonen
35 in das Infundibulum eines Oviduktes einer narkotisierten Fosterm Maus eingespült. 19-20 Tage nach Retransfer werden die implantierten Embryonen geboren. Es werden die in den Figuren 4-9 gezeigten Mäuse erhalten.

Patentansprüche

1. Säugetier mit induzierbarem duktalem Karzinom in situ (DCIS), wobei das Säugetier ein durch laktotrope Hormone aktivierbares Onkogen enthält.
2. Säugetier nach Anspruch 1, wobei sich das DCIS zu invasivem duktalem Mammakarzinom entwickelt.
3. Säugetier nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Onkogen unter der Kontrolle des WAP-Promotors steht.
4. Säugetier nach einem der Ansprüche 1-3, wobei das Onkogen eine für ein starkes T-Zell-Epitop kodierende Sequenz umfaßt.
5. Säugetier nach einem der Ansprüche 1-4, wobei das Onkogen ein für das SV40 T-Ag kodierendes Gen ist.
6. Säugetier nach Anspruch 4 oder 5, wobei die Sequenz für das n118 Epitop des Nucleoproteins des LCM-Virus kodiert.
7. Säugetier nach einem der Ansprüche 1-6, wobei die laktotropen Hormone Oestrogen, Prolactin, Insulin und Hydrocortison umfassen.
8. Säugetier nach einem der Ansprüche 1-7, wobei das Säugetier jenes der Figuren 4,5,6,7,8 oder 9 ist.
9. Verfahren zur Bereitstellung eines Säugetiers nach einem der Ansprüche 1-8, umfassend die folgenden Schritte:
 - (a) Einführung einer für ein Onkogen kodierenden DNA in befruchtete Oocyten eines Säugetiers, wobei die DNA unter der Kontrolle eines Promotors steht, der für laktotrope Hormone spezifisch ist,
 - (b) Implantierung der Oocyten von (a) in pseudoschwa-

ngere Säugetiere, und
(c) Selektion der in (b) erhaltenen Nachkommen auf die Bildung eines DCIS.

- 5 10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei sich das DCIS zu
invasivem ductalen Mammakarzinom entwickelt.
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, wobei der Promotor der
WAP-Promotor ist.
- 10 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9-11, wobei das
Onkogen eine für ein starkes T-Zell-Epitop kodierende
Sequenz umfaßt.
- 15 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9-12, wobei das
Onkogen ein für das SV40 T-Ag kodierende Gen ist.
14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, wobei die Sequenz für
das n118 Epitop des Nucleoproteins des LCM-Virus kodiert.
- 20 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 - 14, wobei die
laktotropen Hormone Oestrogen, Prolactin, Insulin und
Hydrocortison umfassen.
- 25 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 - 15, wobei die
Nachkommen jene der Figuren 4,5,6,7,8 oder 9 sind.
17. Verwendung des Säugetiers nach einem der Ansprüche 1-9
zur Untersuchung von DCIS, seiner Progression zu
30 invasivem ductalen Karzinom und letzterem.
18. Verwendung des Säugetiers nach einem der Ansprüche 1-9
zur Forschung und Entwicklung von diagnostischen Markern
und Therapeutika für ein DCIS bzw. ein invasives ductales
35 Karzinom.

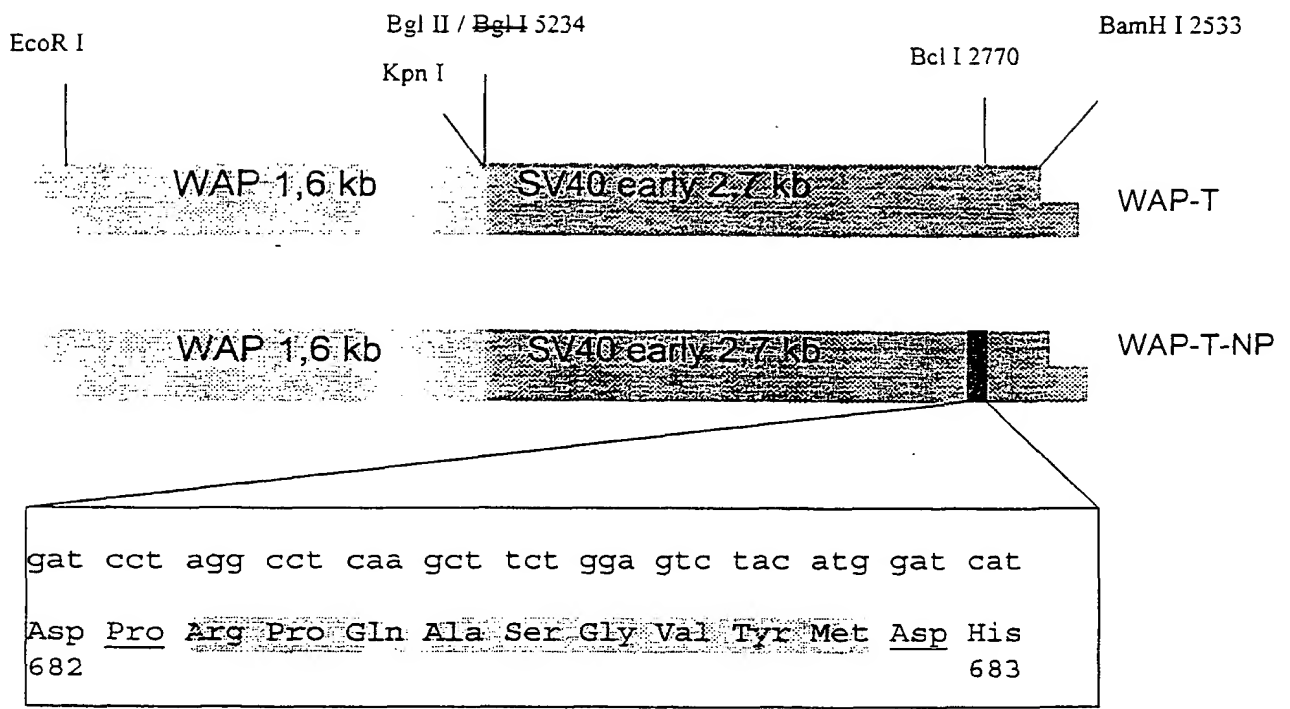


Fig. 1

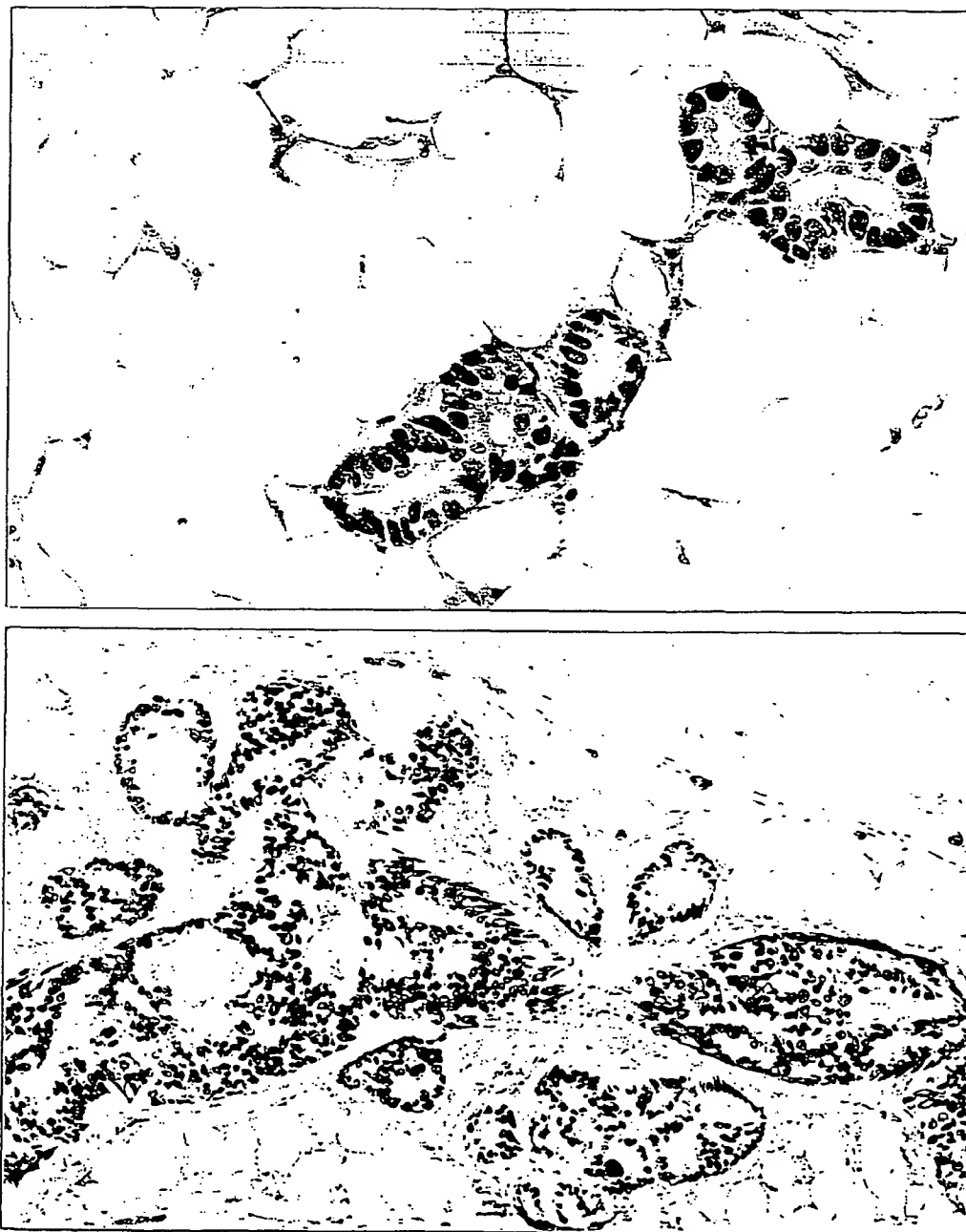


Fig. 2

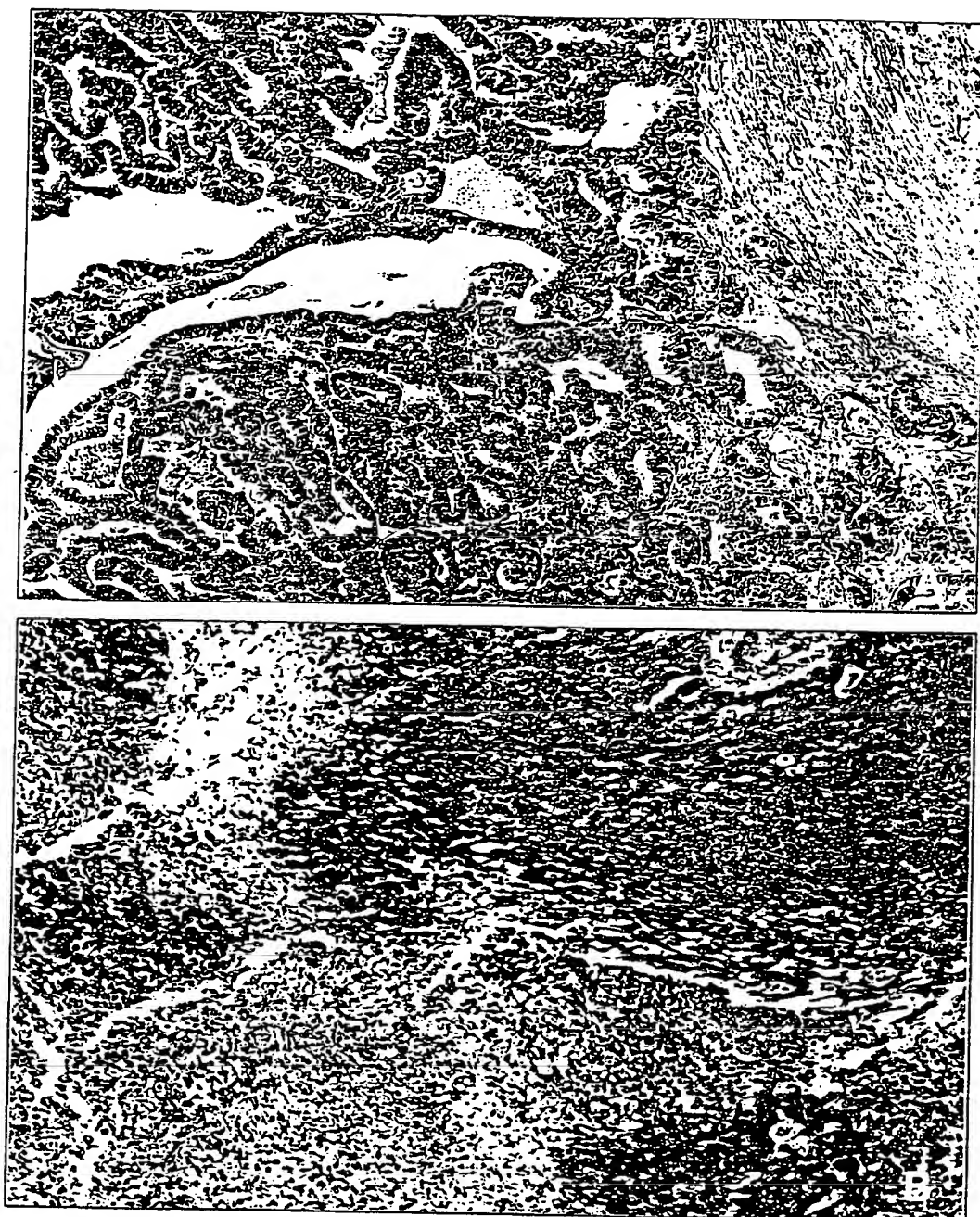


Fig. 3

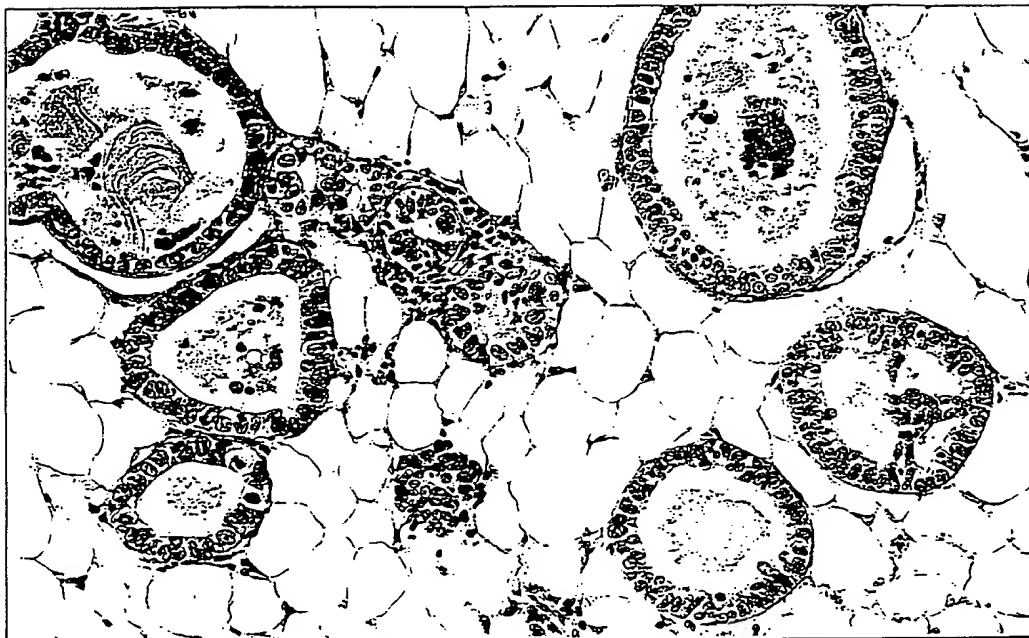


Fig. 4

5/9



Fig. 5

6/9



Fig. 6

7/9

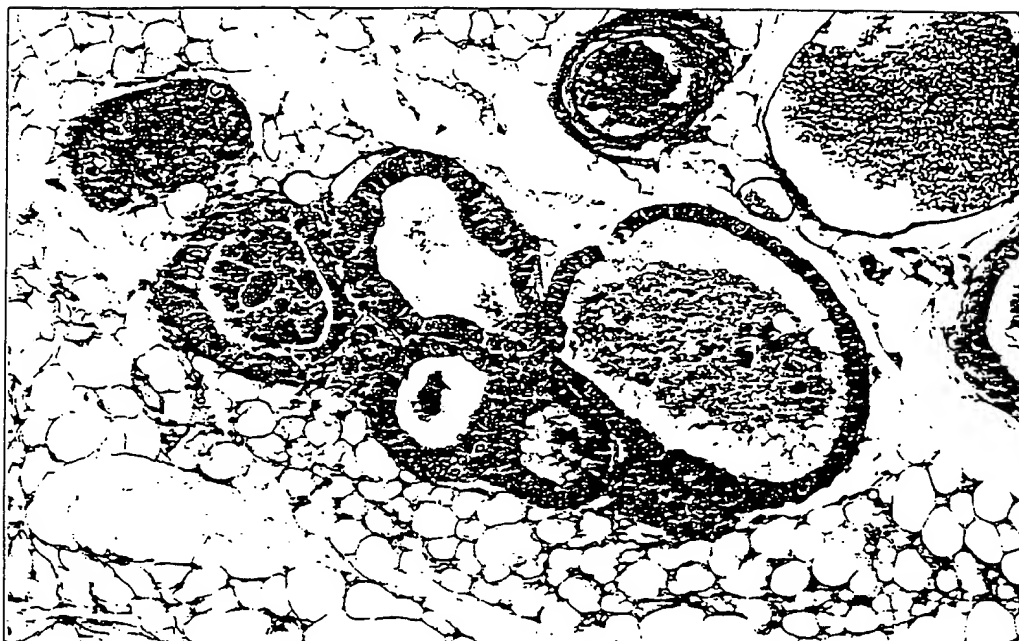


Fig. 7



Fig. 8

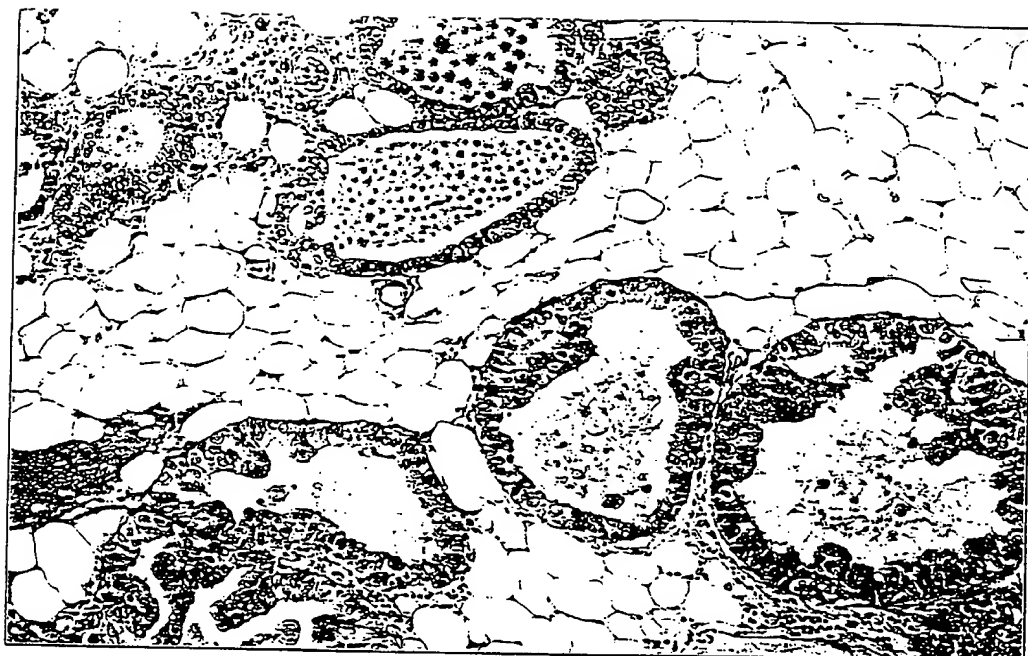


Fig. 9

PCT



ORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

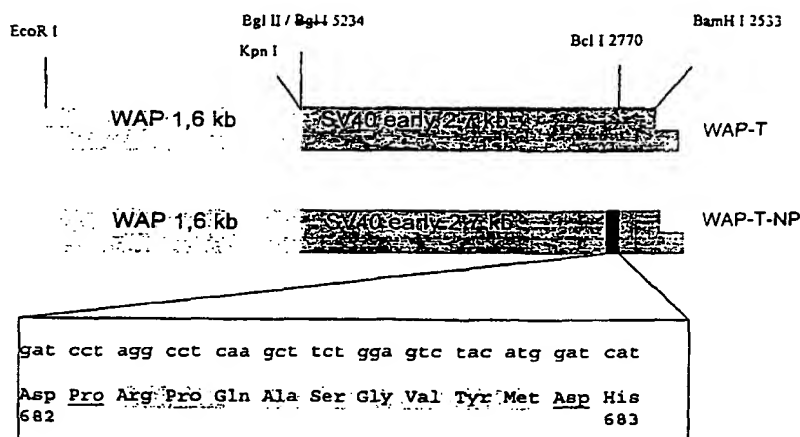


INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/00, A01K 67/027, C07K 14/82, A61K 49/00		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/44889 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. August 2000 (03.08.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/00232 (22) Internationales Anmeldedatum: 26. Januar 2000 (26.01.00) (30) Prioritätsdaten: 199 03 371.4 28. Januar 1999 (28.01.99) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MICE & MORE GMBH & CO. KG [DE/DE]; Martinistrasse 52, D-20251 Hamburg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHULZE-GARG, Chris- tine [DE/DE]; Mortagneweg 7, D-21521 Aumühle (DE). DEPERT, Wolfgang [DE/DE]; Im Hain 14, D-22359 Hamburg (DE). (74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).			(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe- richts: 2. November 2000 (02.11.00)

(54) Title: MAMMAL WITH INDUCIBLE DUCTAL CARCINOMA IN SITU

(54) Bezeichnung: SÄUGETIER MIT INDUZIERBAREM DUKTALEN KARZINOM IN SITU



(57) Abstract

The invention relates to a mammal with inducible ductal carcinoma in situ (DCIS) and containing a prolactin-activated oncogene. The invention also relates to a method for producing such a mammal and to its use for studying a DCIS and the progression thereof towards invasive ductal carcinoma of the breast, as well as for developing diagnostic or therapeutic means for this purpose.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Säugetier mit induzierbarem ductalen Karzinom in situ (DCIS), wobei das Säugetier ein durch laktotrope Hormone aktivierbares Onkogen enthält. Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Säugetiers sowie dessen Verwendung zur Untersuchung eines DCIS bzw. seiner Progression zu einem invasiven ductalen Mammakarzinom, sowie zur Entwicklung von diagnostischen bzw. therapeutischen Mitteln hierfür.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Inter Application No
 PCT/DE 00/00232

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/00 A01K67/027 C07K14/82 A61K49/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A01K C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TZENG, Y.J. ET AL.: "SV40 T/t-antigen induces premature mammary gland involution by apoptosis and selects for p53 missense mutation in mammary tumors." ONCOGENE, vol. 16, no. 16, 23 April 1998 (1998-04-23), pages 2103-14, XP000929570 the whole document	1-5, 7-13, 15-18
X	ROBINSON, G.W. ET AL.: "Understanding mammary gland development through the imbalanced expression of growth regulators." DEVELOPMENTAL DYNAMICS, vol. 206, no. 2, 1996, pages 159-168, XP000929573 the whole document	1-5, 7-13, 15-18

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"8" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 August 2000

Date of mailing of the international search report

21/08/2000

Name and mailing address of the ISA

 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Smalt, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/00232

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 39117 A (UNIV LIVERPOOL ; RUDLAND PHILIP SPENCER (GB); BARRACLOUGH BARRY ROG) 23 October 1997 (1997-10-23) the whole document	1,2,4,5, 8-10,12, 13,16
X	JÄGER, R. ET AL.: "Overexpression of Bcl-2 inhibits alveolar cell apoptosis during involution and accelerates c-myc-induced tumorigenesis of the mammary gland in transgenic mice." ONCOGENE, vol. 15, no. 15, 9 October 1997 (1997-10-09), pages 1787-95, XP000929569 the whole document	1,2,4, 8-10,12, 16-18
A	VAN DER MOST, R. G. ET AL.: "An analysis of cytotoxic T cell response to dominant and subdominant epitopes during acute and chronic lymphocytic choriomeningitis virus infection." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 157, 1996, pages 5543-54, XP002143920 the whole document	4,6,12, 14
A	WO 97 09440 A (SALLER ROBERT MICHAEL ; SALMONS BRIAN (DE); GSF FORSCHUNGSZENTRUM U) 13 March 1997 (1997-03-13) the whole document	
T	SCHULTZ-GARG, C. ET AL.: "A transgenic mouse model for the ductal carcinoma in situ (DCIS) of the mammary gland." ONCOGENE, vol. 19, no. 8, 21 February 2000 (2000-02-21), pages 1028-37, XP000929607 the whole document	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter application No
PCT/DE 00/00232

Pat nt document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication dat
W0 9739117 A	23-10-1997	AU 2572397 A EP 0904363 A	07-11-1997 31-03-1999
W0 9709440 A	13-03-1997	AU 6987696 A EP 0848757 A JP 11511979 T	27-03-1997 24-06-1998 19-10-1999

7

6

4
3
2
1

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/00 A01K67/027 C07K14/82 A61K49/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A01K C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	TZENG, Y.J. ET AL.: "SV40 T/t-antigen induces premature mammary gland involution by apoptosis and selects for p53 missense mutation in mammary tumors." ONCOGENE, Bd. 16, Nr. 16, 23. April 1998 (1998-04-23), Seiten 2103-14, XP000929570 das ganze Dokument	1-5, 7-13, 15-18
X	ROBINSON, G.W. ET AL.: "Understanding mammary gland development through the imbalanced expression of growth regulators." DEVELOPMENTAL DYNAMICS, Bd. 206, Nr. 2, 1996, Seiten 159-168, XP000929573 das ganze Dokument	1-5, 7-13, 15-18
	--- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. August 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

21/08/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Smalt, R

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 39117 A (UNIV LIVERPOOL ;RUDLAND PHILIP SPENCER (GB); BARRACLOUGH BARRY ROG) 23. Oktober 1997 (1997-10-23) das ganze Dokument	1,2,4,5, 8-10,12, 13,16
X	JÄGER, R. ET AL.: "Overexpression of Bcl-2 inhibits alveolar cell apoptosis during involution and accelerates c-myc-induced tumorigenesis of the mammary gland in transgenic mice." ONCOGENE, Bd. 15, Nr. 15, 9. Oktober 1997 (1997-10-09), Seiten 1787-95, XP000929569 das ganze Dokument	1,2,4, 8-10,12, 16-18
A	VAN DER MOST, R. G. ET AL.: "Ananalysis of cytotoxic T cell response to dominant and subdominant epitopes during acute and chronic lymphocytic choriomeningitis virus infection." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 157, 1996, Seiten 5543-54, XP002143920 das ganze Dokument	4,6,12, 14
A	WO 97 09440 A (SALLER ROBERT MICHAEL ;SALMONS BRIAN (DE); GSF FORSCHUNGSZENTRUM U) 13. März 1997 (1997-03-13) das ganze Dokument	
T	SCHULTZ-GARG, C. ET AL.: "A transgenic mouse model for the ductal carcinoma in situ (DCIS) of the mammary gland." ONCOGENE, Bd. 19, Nr. 8, 21. Februar 2000 (2000-02-21), Seiten 1028-37, XP000929607 das ganze Dokument	1-18

INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Intern. Patentzeichen
PCT/DE 00/00232

Im Research nbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9739117	A	23-10-1997	AU	2572397 A	07-11-1997
			EP	0904363 A	31-03-1999
WO 9709440	A	13-03-1997	AU	6987696 A	27-03-1997
			EP	0848757 A	24-06-1998
			JP	11511979 T	19-10-1999

11

12